

Alba ZAREMSKI¹
Salaheddine BAKKALI-YAKHLEF²
Clémence CHAINTREUIL³
YOUNES ABBAS²
Yves PRIN³
Mohamed ABOUROUH²
Marc DUCOSSO³
Christine BAUDASSÉ⁴

¹ Cirad, Upr Génétique forestière
Campus international de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France

² Centre des recherches forestières
Charia Omar Ibn Khattab
BP 763, 10050 Agdal-Rabat
Maroc

³ Laboratoire des symbioses
tropicales et méditerranéennes
Umr 113, Agro.M-Cirad-Inra-Ird Um2
TA 10/J, Campus international
de Baillarguet
34398 Montpellier Cedex 5
France

⁴ Cirad, Upr Production et valorisation
des bois tropicaux
TA 10/16
34398 Montpellier Cedex 5
France

Caractérisation moléculaire du M'jej, agent de dépérissement des cédraies marocaines

Dans les cédraies contaminées, le « M'jej » provoque une pourriture fibreuse du bois de cœur, qui diminue le rendement au sciage de 40 %. Les agents de cette maladie fongique – décrits jusqu'ici d'après les caractères des carpophores – se rattachent à *Phellinus chrysoloma* ou à *P. pini*. Les travaux présentés, qui s'appuient sur la caractérisation moléculaire d'échantillons récoltés sur des arbres atteints comparés à des séquences de référence, montrent la proximité taxinomique des deux espèces et suggèrent leur synonymie.



Photo 1.
Vue générale de la cédraie d'Aïn Kahla, Maroc.
Photo A. Zaremski.

Alba ZAREMSKI,
 Salaheddine BAKKALI-YAKHLEF,
 Clémence CHAINTREUIL,
 Younes ABBAS, Yves PRIN,
 Mohamed ABOUROUH,
 Marc DUCOUSO,
 Christine BAUDASSÉ

RÉSUMÉ

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU M'JEJ, AGENT DE DÉPÉRISSEMENT DES CÉDRAIES MAROCAINES

Le cèdre fournit un bois apprécié depuis plusieurs millénaires. Néanmoins, son importance économique reste limitée du fait de sa répartition géographique restreinte au bassin méditerranéen et à l'Himalaya. *Cedrus atlantica* occupe une place majeure parmi les espèces de ce genre, avec des peuplements très importants au Maroc. Le bloc du Moyen Atlas marocain (130 000 ha) est exposé à des maladies cryptogamiques, en particulier le « M'jej », qui diminue de 40 % le rendement au sciage. Le M'jej provoque une pourriture fibreuse du bois de cœur. Parmi les nombreux genres et espèces fongiques décrits comme responsables du M'jej, tous sont synonymes soit de *Phellinus chrysoloma*, soit de *P. pini*. Identifiées suivant les caractères morphologiques, anatomiques et écologiques des carpophores, ces deux espèces seraient les principaux agents responsables du M'jej. Nos travaux de caractérisation moléculaire d'échantillons récoltés sur des arbres malades et la comparaison avec des séquences de référence montrent la proximité taxinomique de ces deux espèces, suggérant leur synonymie.

Mots-clés : caractérisation moléculaire, cèdre, ITS, pourriture fibreuse, Maroc.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERISATION OF "M'JEJ" DISEASE AS A FACTOR IN THE DECLINE OF MOROCCO'S CEDAR FORESTS

Although cedar wood has been highly valued for thousands of years, its economic importance is limited by a geographical range that extends no further than the Mediterranean Basin and the Himalayas. *Cedrus atlantica* is one of the main species in this family, with a large population in Morocco. The 130 000-ha cedar forest in the Middle Atlas in Morocco is particularly exposed to fungal diseases such as "M'jej", which has reduced sawmill yields by some 40%. This disease causes fibrous rot in the heartwood. The many families and species of fungus described as responsible for the disease all appear to be synonymous with either *Phellinus chrysoloma* or *P. pini*. These two species, which have been identified by the morphological, anatomical and ecological features of their fruiting bodies, appear to be the main factors responsible for "M'jej" disease. The molecular characterisation of samples collected from diseased trees and their comparison with reference sequences show the taxonomic similarity of the two species, suggesting that they are synonymous.

Keywords: molecular characterisation, cedar, ITS, fibrous rot, Morocco.

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL M'JEJ, AGENTE CAUSAL DEL DECAIMIENTO DE LOS CEDRALES MARROQUÍES

El cedro proporciona una madera apreciada desde hace miles de años. Sin embargo, su importancia económica sigue siendo reducida debido a su reparto geográfico, circunscrito a la cuenca mediterránea y al Himalaya. Con importantes masas en Marruecos, *Cedrus atlantica* ocupa un lugar destacado entre las especies de este género. El rodal del Atlas Medio marroquí (130 000 ha) está expuesto a enfermedades criptogámicas, especialmente al « M'jej », que reduce en un 40% el rendimiento del aserrío. El M'jej causa una pudrición fibrosa de la madera del corazón. Hay muchos géneros y especies fúngicas descritos como causantes del M'jej. Todos son sinónimos bien de *Phellinus chrysoloma*, bien de *P. pini*. Estas dos especies, identificadas según los caracteres morfológicos, anatómicos y ecológicos de los carpóforos, serían los principales agentes responsables del M'jej. Nuestros trabajos de caracterización molecular de muestras tomadas en árboles enfermos y la comparación con unas secuencias de referencia muestran la proximidad taxonómica de ambas especies, lo que sugiere su sinonimia.

Palabras clave: caracterización molecular, cedro, ITS, pudrición fibrosa, Marruecos.

Introduction

Dans le bassin méditerranéen, depuis plusieurs millénaires, le bois aromatique du cèdre, de couleur brun-jaune à rosée, est apprécié pour ses valeurs technologiques, notamment, sa faible densité (de 0,5 à 0,6), la finesse de son grain et sa durabilité naturelle élevée. Ce dernier caractère permet de le mettre en œuvre en extérieur, sans traitement particulier. Grâce à ces qualités remarquables, les populations riveraines des cédraines vivent directement de ces ressources.

Cependant, sur le plan mondial, l'importance économique de cette essence reste modeste, du fait de sa répartition géographique limitée. En effet, les cèdres ne sont présents naturellement que dans certaines zones montagneuses :

- Dans le bassin méditerranéen, entre 1 300 et 2 600 m d'altitude, avec *Cedrus atlantica* Manetti au Maroc et en Algérie, *C. brevifolia* Henry à Chypre, *C. libani* Loud au Liban et en Turquie.
- Dans l'Himalaya, entre 3 000 et 4 000 m d'altitude, avec *C. deodora* Loud.

Cedrus atlantica, le cèdre de l'Atlas, dont les populations s'organisent en sept blocs, trois en Algérie et quatre au Maroc, est l'espèce la plus importante, tant par les surfaces occupées que par sa production annuelle. Le bloc de l'Atlas marocain, avec 130 000 ha essentiellement sur des sols calcaires du lias et du jurassique, est le plus grand bloc d'entre eux et permet aujourd'hui d'assurer l'essentiel de la production de sciage de cèdre (photo 1).

Sur ce chapitre, il convient de rappeler qu'un bois naturellement résistant aux champignons lignivores peut rester sensible à des attaques cryptogamiques du bois dans un arbre sur pied. Les principales pourritures du bois dans les arbres sur pied sont causées par des champignons, dont l'action peut débiter soit par les racines (*Armillaria mellea*, *Fomes annosus*, *Polyporus schweinitzii*...),



Photo 2.

Branches cassées sur un cèdre adulte, élément favorable à l'installation du M'jej.
Photo A. Zaremski.

soit par une blessure des parties aériennes : le bois de cœur étant mis à nu et l'aubier, quant à lui, dans certains cas, pouvant être attaqué (*Xanthochrous pini*, *Polyporus sulfureus*, *Phellinus dryadeus*, *Fistulina hepatica*, *Ungulina fomentaria*, *Ungulina betulina*, *Stereum frustulatum*, *Ganoderma applanatum*...).

Cedrus atlantica, espèce naturellement résistante, peut être soumise à des pressions parasitaires diverses, notamment la maladie du « M'jej » (LANIER, 1994) qui altère, parfois lourdement, la valeur de ses peuplements. Les dégâts occasionnés sont d'autant plus importants que la cédraie est

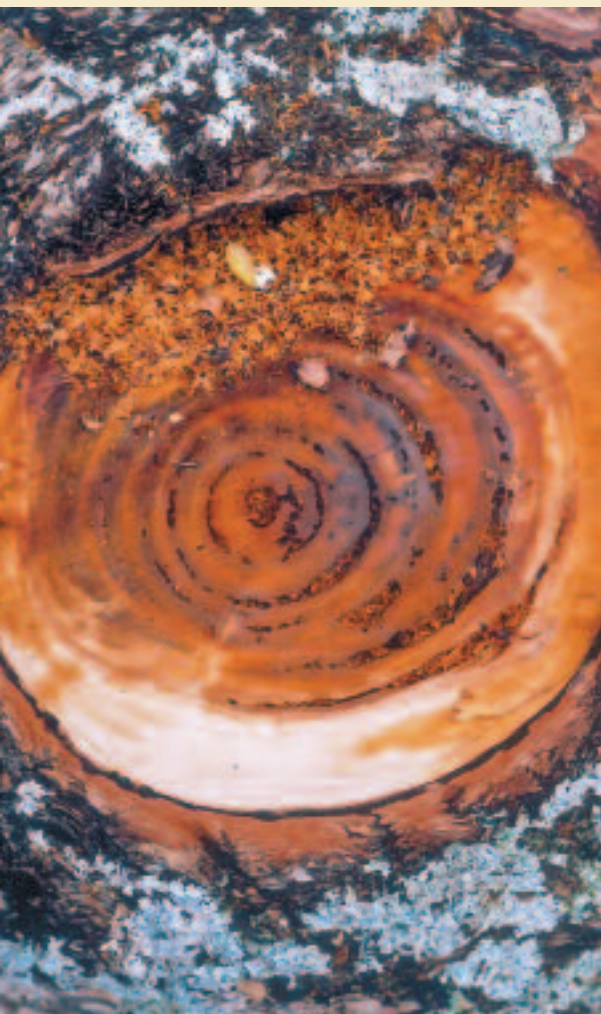


Photo 3.

La pourriture induite par le M'jej, visible sous forme d'anneaux concentriques, est localisée dans le cœur du bois, l'aubier demeurant sain en apparence. Nous observons la décoloration et la décomposition du bois de cèdre attaqué par la maladie du M'jej. Photo A. Zaremski.

affaibli par des causes abiotiques comme l'aggravation des sécheresses chroniques et des causes anthropiques, au premier rang desquelles l'élevage en forêt. Ainsi, cette maladie du cèdre peut concerner, dans certains cas, jusqu'à 80 % des arbres sur pied, plutôt âgés (200 à 400 ans), affectant de 40 % le rendement en sciage. Outre ces situations exception-

nelles, les taux moyens d'infestation du massif restent élevés, de l'ordre de 12 %, plaçant cette maladie au rang de fléau de la cédraie marocaine (FAIQI, ABOUROUH, 1990).

Après examen des synonymies, deux champignons de pourriture fibreuse ont été identifiés comme principaux agents du M'jej (LANIER, 1994) :

- *Phellinus chrysoloma* (Fr.) Donk., connu sous le nom de pourriture rouge ou pourriture annulaire du cèdre ;
- *Phellinus pini* (Thore ex-Fr.), caractérisé par la pourriture blanche active qu'il développe chez de nombreux résineux, notamment le cèdre.

Ce sont des basidiomycètes qui appartiennent à la famille des polyporacées, de l'ordre des aphyllophorales. Ils n'infestent que le bois mort des arbres vivants. Le bois mort apparaît dans les arbres vivants sous forme de cœur du bois, ce qui est le cas chez les espèces d'arbres qui développent un cœur à partir d'un certain âge, comme les *Cedrus*. Bien que les jeunes cèdres ne soient pas victimes de l'infestation, il conviendrait, cependant, de préciser ultérieurement l'âge minimal à partir duquel ils sont susceptibles d'être infestés. Dans notre étude, les plus jeunes parmi les cèdres infestés par le M'jej étaient âgés d'environ 100 ans.

Le nombre, l'âge et la position sur l'arbre des fructifications permettent d'estimer l'importance de la pourriture dans le bois de cœur, l'aubier restant le plus souvent indemne. Ainsi, l'arbre atteint par le M'jej peut survivre et rester sur pied jusqu'à et même au-delà de la destruction complète de son bois de cœur.

Afin de développer des pratiques sylvicoles qui permettent de limiter l'impact économique de cette maladie du cèdre, une étude fondée sur la caractérisation moléculaire *in situ* des champignons impliqués dans cette maladie a été développée afin, dans un premier temps, de préciser l'identité des parasites fongiques et leur étiologie.

Matériel et méthodes

Sites d'étude et échantillonnages

Les collectes ont été effectuées dans la forêt d'Azrou (Moyen Atlas), en octobre 2005, à environ 1 800 m d'altitude, dans les parcelles des cédraies suivantes : parcelle 76 de Michlifén, parcelle 54 de Boutrouba et parcelle 55 de Aïn Kahla. Le matériel biologique récolté est constitué de carpophores frais, de bois infestés de mycélium et de carottages effectués dans des arbres sur pied et présentant des carpophores sur le tronc. Les carottages de bois ont été réalisés dans l'aubier, à l'aide d'une tarière de Presler de 20 cm. La liste des échantillons avec leur numéro d'identification et leur localisation est présentée en tableau I.

Caractérisation moléculaire des champignons

L'extraction de l'Adn fongique a été réalisée à partir d'un fragment d'environ 50 mg d'échantillon avec le kit de purification de l'Adn pour végétaux supérieurs DNeasy (Qiagen, Courtabœuf, France)

Les régions *I*ts (*intergenic transcribed spacer*) de l'Adnr nucléaire ont été amplifiées par Pcr (*polymerase chain reaction*) avec les amorces *I*ts1, 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' et *I*ts4, 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (GARDES, BRUNS, 1993). Les produits Pcr obtenus sont séparés sur gel d'agarose et purifiés à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction (Qiagen, Courtabœuf, France) avant de procéder au séquençage qui est sous-traité par la société MacroGen en Corée. Les séquences corrigées et assemblées ont été comparées par BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997) avec les séquences nucléiques des banques de données (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn>). Les résultats des comparaisons de séquences sont présentés sous forme du ratio d'homologie entre les séquences obtenues et les séquences de référence les plus proches.

Résultats et discussion

Les arbres des cédraies visitées présentent souvent des blessures ou des branches cassées apparemment dues principalement à la foudre et au vent (photo 2).

Les cèdres abattus sur lesquels ont été prélevés nos échantillons sont âgés (environ 400 ans voire plus). Les symptômes internes, sur une coupe transversale du tronc, se manifestent par la présence d'hyphes de champignon de couleur ocre à brunâtre. L'attaque du champignon débute par une « décoloration » brune à rougeâtre du bois de cœur (photo 3). Cette décoloration est irrégulière, en forme de croissant le long des cernes annuels (photo 3). La zone de l'aubier ne présente, en général, pas d'attaque, sauf si les troncs sont très gravement atteints (photo 4). La décoloration est suivie d'une décomposition du bois, qui montre la présence de poches tapissées de fibres de cellulose blanches. Les poches sont séparées entre elles par des bandes de bois compactes. Ce champignon donne au bois attaqué une odeur fongique et une coloration caractéristique. La progression de l'infection s'effectue aussi bien dans le sens longitudinal que radial (photo 5). Le bois fortement attaqué est inutilisable.

Les symptômes externes révèlent la présence, sur le tronc, de fructifications du champignon ou carpophores en forme de consoles renversées ou de protubérances, de couleur grisâtre à brunâtre. La face inférieure est brun-jaunâtre et comprend de grands pores assez irréguliers. La taille de ces carpophores peut aller jusqu'à 15 cm, dans le sens de la plus grande largeur (photo 6).

Les carottes réalisées dans l'aubier ne présentent pas de signes visibles d'une présence fongique alors que des carpophores sont visibles sur le tronc.

Nous n'avons pas obtenu d'amplification d'Its fongiques à partir de l'échantillon I-55-2 provenant du carottage effectué dans l'aubier d'un cèdre, cela pour toutes les dilutions de l'extrait d'Adn testées. Pour tous les autres échantillons, nous avons obtenu des amplifiats d'Its fongiques. Les séquences obtenues ont toutes pu être analysées pour les deux brins complémentaires de l'Adn générant des fragments d'au moins 700 paires de bases. Pour l'échantillon de carpophore (I-55-1), les comparaisons de séquences (tableau II) indiquent une très grande proxi-

Tableau I.
Liste, origine et nature des échantillons étudiés.

Numéro de l'échantillon	Parcelle	Descriptif de l'échantillon
76-1	Michlifen 76	Bois de cœur infesté d'un cèdre mort sur pied
54-1	Boutrouba 54	Bois de cœur infesté d'un cèdre abattu
54-2		Bois de cœur infesté d'un cèdre abattu
54-3		Bois de cœur infesté d'un cèdre abattu
I-55-1 I-55-2	Aïn Kahla 55	Carpophore frais sur cèdre sur pied Carottage dans l'aubier de cèdre sur pied présentant des carpophores sur le tronc.

Tableau II.
Résultat de la recherche de similarité des séquences nucléotidiques de nos échantillons avec l'espèce et le genre de champignon le plus proche référencés dans Ncbi.

Echantillon	Espèce fongique probable (résultat BLASTn)	Numéro d'accession	Nombre de paires de bases soumis	Nombre de paires de bases comparées (% d'homologie)
76-1	Non interprétable	AY 97 2364	855	102/124 (82)
54-1	Non interprétable	AF 121283	824	172/186 (92)
54-2	<i>Coniophora puteana</i>	AY 736023	699	687/688 (99)
55-1	<i>Porodaedalea pini</i>	AY 436621	856	415/432 (96)
55-1	<i>Phellinus chrysoloma</i>	DQ103886	856	416/433 (96)

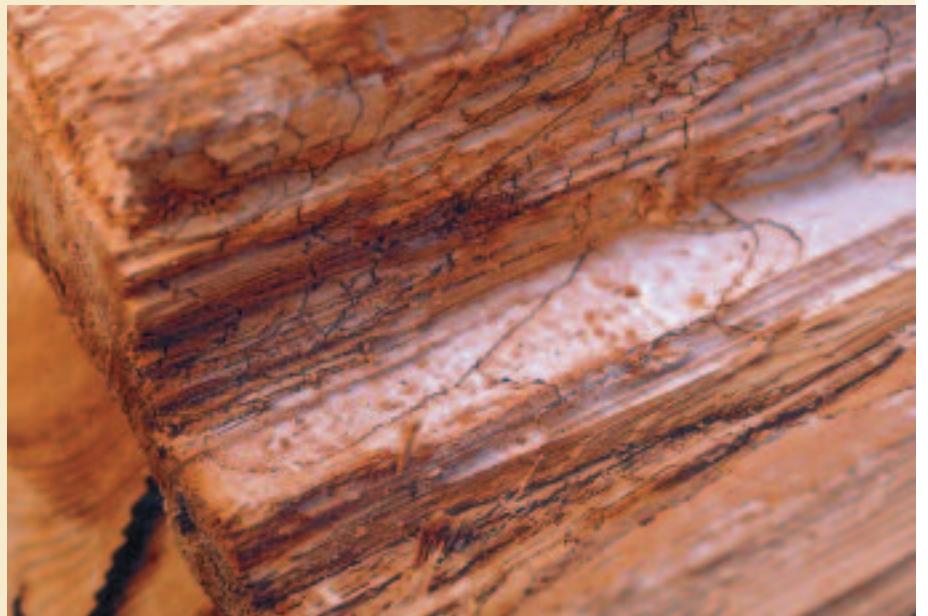


Photo 4.

Décomposition du bois de cèdre attaqué par la maladie du M'jej. Les différents degrés de décomposition du bois de cœur sont bien visibles.
Photo A. Zaremski.

Photo 5.

Bois de cœur infesté par le mycélium blanchâtre et les hyphes brunâtres de l'agent du M'jej.
Photo A. Zaremski.



mité génétique avec des séquences de référence des espèces *Phellinus chrysoloma* et *P. pin.* (synonyme : *Porodaedalea pin.*).

Pour les échantillons de bois de cœur infestés par du mycélium, les comparaisons de séquences ont révélé une très grande proximité taxinomique avec *Coniophora puteana* (basidiomycète de pourriture cubique) pour l'échantillon 54-2.

L'infection par le M'jej est limitée au bois de cœur. Cette observation est confirmée par les résultats obtenus de l'échantillon réalisé, après carottage, dans l'aubier d'un cèdre sur pied présentant des carpophores sur le tronc. En effet, après

extraction de l'Adn, nous ne décelons pas de champignons dans l'aubier de cèdre, ce qui n'exclut en rien la possibilité de la présence du champignon, mais cela conforte les examens macroscopiques qui ne permettent pas de voir de mycélium dans l'aubier. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'infection se fait par contact direct de propagules de champignons avec le bois de cœur, suite à des blessures provoquées par différentes causes : branches cassées, blessures d'incendie ou de foudre, blessures causées par d'autres arbres tombés (coupe d'exploitation, vent, neige, etc.). Ces hypothèses ont aussi été émises par LANIER (1994).

Les échantillons de bois de cœur analysés ne permettent pas de retrouver le genre *Phellinus*, mais des champignons classiques qui altèrent le bois mort uniquement (FOUGEROSSE, 1974). Il semblerait que cette absence soit due au fait que ces échantillons ont été prélevés une semaine après l'abattage. D'après FOUGEROSSE (1974), si certaines attaques correspondent à un véritable parasitisme du champignon sur l'arbre vivant, ce qui signifie qu'elles cessent à la mort de l'arbre, d'autres procèdent d'un phénomène mixte de saprophytisme et de parasitisme et peuvent, donc, se poursuivre après l'abattage.

Conclusion et perspectives

Ces résultats conduisent à émettre l'hypothèse que la maladie du M'jej implique plusieurs champignons ; les contaminations par ces champignons s'étant développées soit simultanément, soit successivement. Seul l'examen de stades très précoces de l'infection permettrait de déterminer si *Phellinus chrysoloma* est l'unique agent responsable du déclenchement du M'jej.

Ces travaux pourraient être également utilisés pour suivre le développement des champignons dans le bois et définir par des examens épidémiologiques de l'infestation par le M'jej (hauteur de l'infestation, pourcentage de l'infestation...) les modalités de protection de ces forêts contre la maladie. Enfin, des techniques sylvicoles appropriées pourraient être développées afin de lutter contre cette maladie. L'objectif final étant l'augmentation des rendements en scierie, tout en préservant l'environnement par une utilisation optimale de fongicides.

Remerciements

Nous remercions tous ceux qui ont contribué à cette étude, en particulier toute l'équipe du Centre des recherches forestières de Rabat, dirigée par Monsieur Abourough.

Références bibliographiques

ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHAFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J., 1997. Gapped BLASTn and PSI-BLASTn: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 : 3 389-3 402.

FAIQI M., ABOUROUH M., 1990. Estimation des pertes en productivité causées par le tramète des pins (*Trametes pini*) dans la cédraie du Moyen Atlas. Ministère de l'agriculture et de la réforme agraire, direction des eaux et forêts et de la conservation des sols, 10 p.

FOUGEROUSSE M., 1974. Notes de mycologie du bois. Centre Technique Forestier Tropical, 75 p.

GARDES M., BRUNS T., 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 : 113-118.

LANIER L., 1994. Les champignons des cédraies en Algérie (étude comparative). *Annales de la Recherche Forestière au Maroc*, 27 (2) : 553-563.

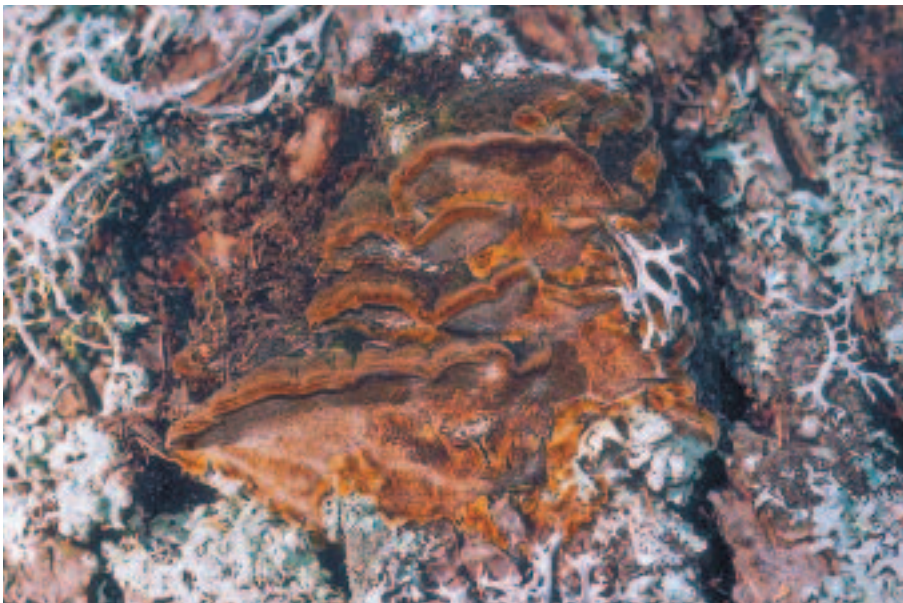


Photo 6.

Carpophore de l'agent du M'jej, sur tronc de cèdre.
Photo A. Zaremski.